

動脈硬化症の炎症学的検討

－高脂血症患者血清における CRP・LP 複合体の確認－

学校教員養成課程 97-1 浅川 恵美

1. 研究目的

CRP は C-reactive protein (C-反応性タンパク) の略であって、生体内における急性炎症や組織崩壊の発生早期に著しく増量する血漿タンパクの一つである。

これまで、ゲル濾過法を用いた研究により、高脂血症患者血清中に CRP とリポタンパク (LP) の複合体が存在することが報告されている。さらに、単球由来マクロファージがこの CRP・LP 複合体を異常蓄積して泡沫化し、その泡沫化細胞の集簇が動脈硬化の初期段階であるアテローム硬化病変の起源となる可能性も示唆された。

しかし、試料の分子量の違いを用いたゲル濾過法において、先に溶出された分子量の大きい CRP は LP と結合しているのではなく、単に共存しているだけではないかという疑いが生じた。もし、CRP と LP が共存しているだけならば、CRP と LP の結合を阻止することによる動脈硬化性病変発生の予防効果は、あまり期待できないものとなってしまう。

そこで本研究では、以前と同じカラムクロマトグラフィー (カラム) を用いたゲル濾過法により、「CRP は Ca^{2+} 依存性にリガンドと結合する」という特性に着目し、CRP と LP の結合性、すなわち高脂血症患者血清中において、CRP・LP 複合体が形成される可能性の確認を目的とした。

2. 研究方法

①実験試料

T-chol の血清中濃度が 220mg/dl 以上、TG の血中濃度が 150mg/dl 以上の両方の基準を満たす CRP 陰性 (－) の血清を高脂血清とし、T-chol が 130mg/dl 以上、 180mg/dl 未満、TG が 50mg/dl 以上、 110mg/dl 未満の両方の基準を満たす CRP 陰性 (－) の血清を正常血清とした。

ヒト CRP は、CRP 高値血清からアフィニティーカラムを用いて分離精製し凍結乾燥したものを使用した。

②実験方法

直径 1.4cm、長さ 100cm のカラムという透明な筒に、ゲル担体を充填し、2l 以上の溶出液で平衡化した。このカラム上に試料を注入し、1 時間に約 10ml の速度で溶出し、ゲル濾過液を 3ml ずつのフラクションとして採集した。溶出液はトリス生食 Ca^{2+} 、およびエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediamine tetra acetic acid : EDTA) 加トリス生食を使用した。

ゲル濾過では、溶液中に混在する様々な大きさの分子がゲルの充填されたカラムを通ることにより、その大きさの違いによって連続的に分離される。試料をゲルが充填されたカラムに添加すると、マトリクスに入り込めない大きな分子は最初にカラムから溶出し、続いて小さな分子が、その大きさの順に溶出してくることになる。すなわち本研究では、上記のゲル濾過法の原理により、脂質成分と結合した CRP は早く、フリーの CRP はそれより遅く溶出されるため、両者の分離が可能であることを利用している。

また、各フラクション中のタンパク質濃度は、紫外線吸収法 (UV 法) を用いて、280nm における吸光度により推定した。

さらに、血清中 CRP の有無の判定は、CRP テストキットワコーを使用し、CRP の濃度測定は、ラテックス凝集免疫ネフェロメトリ法により定量した。

3. 結果および考察

正常血清 10ml (TG 68.1mg/dl, T-chol 154.6mg/dl) に CRP 3mg を添加し、トリス生食 Ca^{2+} でゲル濾過した結果、CRP の溶出パターンは一峰性を示した (図 1)。ところが、高脂血症患者血清 10ml (TG 505mg/dl, T-chol 286mg/dl) に CRP 3mg を添加しゲル濾過した際には、CRP の溶出パターンは二峰性を示した (図 2)。さらに、カルシウムのキレート (吸着) 剤である EDTA を添加したトリス生食を溶出液として、高脂血症患者血清 10ml (TG 440mg/dl, T-chol 268mg/dl) に、CRP 3mg を加えゲル濾過した。その結果、CRP の溶出パターンは、CRP 添加正常血清をゲル濾過したときと同様に一峰性を示し、その溶出ピークは、CRP 添加高脂血清のゲル濾過において後方に溶出された CRP のピークとほぼ一致していた (図 3)。

これらの結果から、CRP 添加高脂血症患者血清において、CRP と LP は単に共存しているだけではなく、CRP は Ca^{2+} 依存性に LP と結合し、CRP・LP 複合体として存在していることが再確認された。また EDTA は、CRP と高脂血清中の LP との結合を阻害し、CRP・LP 複合体を解離させるということが明らかになった。すなわち、CRP・LP 複合体はマクロファージに取り込まれやすく、その後マクロファージが泡沫化してアテローム硬化発生を引き起こすのであれば、CRP・LP 複合体の形成を阻害する EDTA は、動脈硬化の予防・治療薬の一つとして活用することに対する可能性が示唆された。しかし EDTA は、体内において血液の抗凝固剤としての働きをもつため、動脈硬化の予防や治療を目的に用いることは実際には困難である。

そこで、動脈硬化症の発生に CRP が関与する炎症学的機序を考えた場合、動脈硬化の新しい予防方法として、本研究で用いた EDTA の代用となる抗炎症剤を利用した治療法に注意をはらうべきである。抗炎症剤による治療は、動脈硬化初期段階のアテローム硬化発生及び進展の一つの危険要素である CRP・LP 複合体に直接的に働きかけ、結合を阻害ならびに解離させるため、非常に有効なものであると考えられる。

本研究は、EDTA を用いた結合確認の基礎的研究であったが、結合解離を確認することにもなったため、今後は抗炎症剤による CRP と LP 解離についての研究を重ね、効果的な予防・治療薬について検討する必要があると思われる。

4. 今後の課題

本研究で得られた結果は、人工的に CRP を添加した高脂血症患者血清についてのものである。そこで今後は、炎症反応をおこしている高脂血症患者血清中の CRP・LP 複合体に対する、抗炎症剤の作用に関する検討が必要と考える。抗炎症剤は、動脈硬化発生の予防に効果的であるが、その阻害力や利用方法については十分な知見が得られていないため、今後さらに研究をかさね、有効な抗炎症剤による予防・治療方法を追求していくことが望まれる。

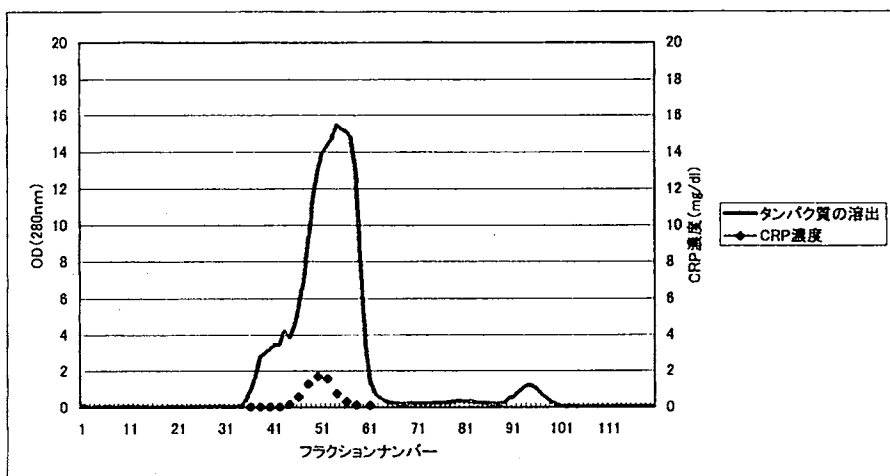


図1 CRP添加ヒト正常血清の、トリス生食Ca²⁺を用いたゲル濾過 (OD: 280nmにおける吸光度)

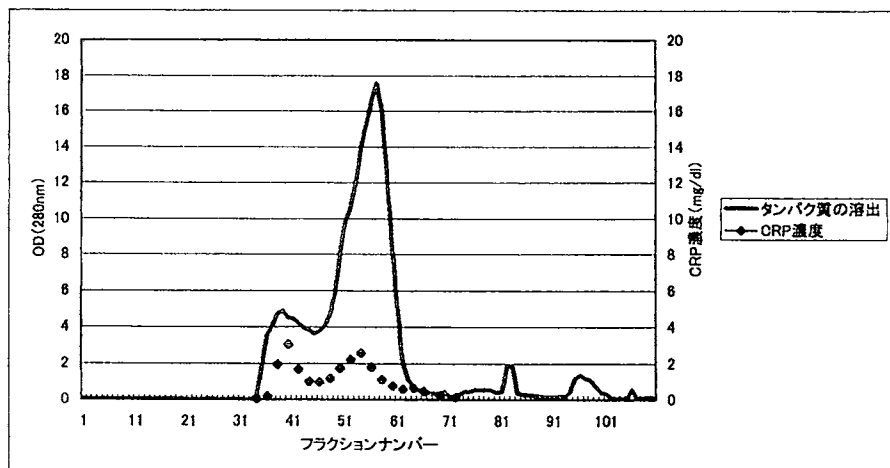


図2 CRP添加ヒト高脂血清の、トリス生食Ca²⁺を用いたゲル濾過 (OD : 280nmにおける吸光度)

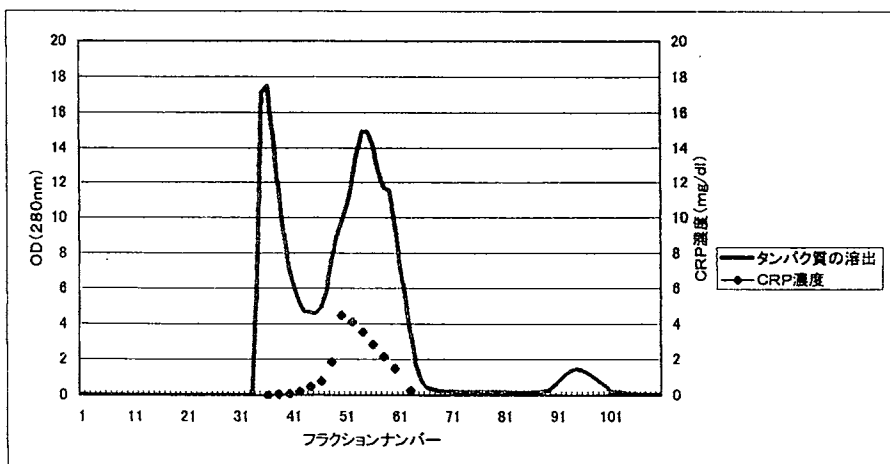


図3 CRP添加ヒト高脂血清の、EDTA加トリス生食を用いたゲル濾過 (OD : 280nmにおける吸光度)